

Micropropagation de l'hévéa par embryogenèse somatique

Carron M.P. ¹, Lardet L. ¹, Dea B.G. ²

¹ CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

² IDEFOR-DPL, BP 1536, 01 Abidjan, Côte d'Ivoire

Les recherches pour mettre au point l'embryogenèse somatique de l'hévéa (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) ont été entreprises dès les années 70. A l'instar de la plupart des espèces ligneuses, l'hévéa fut, au départ, réputé récalcitrant à la culture *in vitro*. Après plusieurs années de recherches, des vitroplants ont été régénérés chez plusieurs clones d'intérêt industriel (Carron *et al.*, 1989). Aujourd'hui, plusieurs milliers de vitroplants ont été produits par ce procédé, dans un cadre expérimental.

Nous présentons d'abord les différentes phases d'un procédé d'embryogenèse somatique entretenue, puis les rendements obtenus et, enfin, les facteurs limitants dans une perspective de production de plants à grande échelle. Des éléments de stratégie sont proposés pour les dix prochaines années afin d'achever la mise au point du procédé et son intégration dans les schémas classiques d'amélioration de l'hévéa.

Matériel et méthodes

Les phases du procédé sont schématisées dans la figure 1.

Initiation de la callogenèse

Le tégument interne de la graine immature constitue l'explant initial : tissu maternel aseptique possédant le génotype du clone de greffe sur lequel le fruit a été prélevé.

Embryogenèse somatique à partir de cal primaire

Après un mois de culture, le cal obtenu peut être orienté vers la régénération d'embryons somatiques. Cette voie a été abondamment travaillée et décrite dans plu-

sieurs publications entre 1985 et 1993 (Carron *et al.*, 1995).

Obtention de lignées friables proliférantes

Depuis 1993, une nouvelle voie a été définie. Dans le milieu de callogenèse, certains paramètres (Ca, saccharose, phytohormones) permettent de stimuler la formation de lobes friables sur les cals (Montoro *et al.*, 1993). Plusieurs repiquages systématiques (4 à 6), sur de tels milieux, permettent de stimuler ce phénomène, tout en inhibant l'expression de l'embryogenèse, c'est-à-dire la formation des embryons somatiques. Cependant, la friabilité n'est pas

un caractère suffisant ; il est également nécessaire que le cal acquiert une forte capacité de prolifération. Les conditions d'acquisition de celle-ci n'ont pas encore été déterminées avec précision. L'expérimentateur doit donc être attentif pour déceler, sur l'ensemble de l'expérimentation, les quelques cals qui exprimeront ce caractère (0 à 5 %). Un suivi histologique permet de vérifier que les conditions expérimentales utilisées sont compatibles avec le maintien des caractéristiques embryogènes du cal. La stabilisation de la lignée embryogène proliférante nécessite, à nouveau, plusieurs sous-cultures sur un milieu appauvri en phytohormones, pour parvenir à un maté-

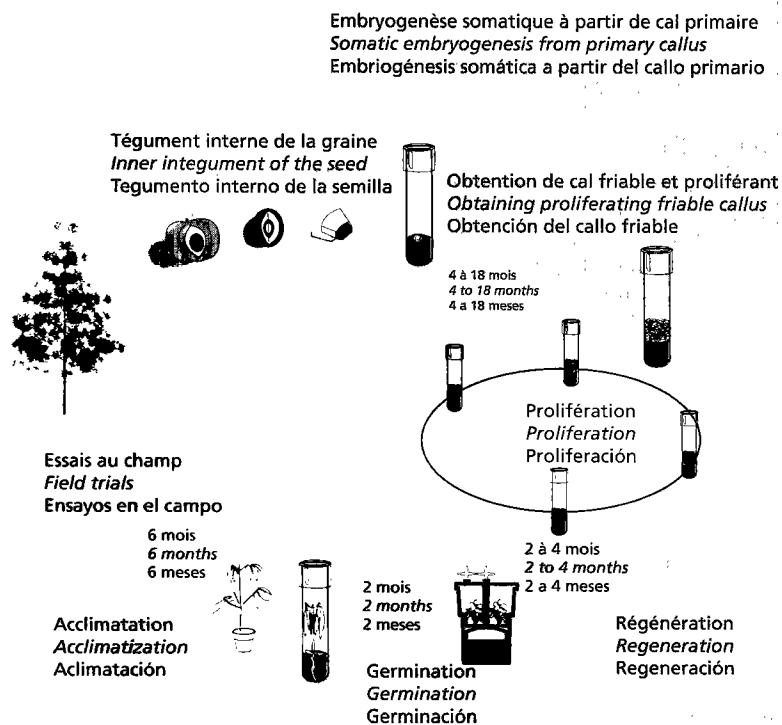


Figure 1. Embryogenèse somatique entretenue chez l'hévéa. / Maintained somatic embryogenesis of Hevea. / La embrionogénesis somática mantenida en el hevea.

Communication présentée au séminaire « Les outils biochimiques et moléculaires pour la gestion de l'exploitation et l'amélioration de l'hévéa » qui s'est tenu à l'université de Mahidol, Bangkok, Thaïlande, du 20 au 24 octobre 1997.

riel de structure homogène et exprimant un niveau de prolifération régulier, d'une sous-culture à l'autre.

Entretien des lignées embryogènes

Les lignées embryogènes sont entretenues, sur un milieu de prolifération faiblement concentré en auxine et cytokinine, par des repiquages réguliers tous les 15 jours (le poids frais est multiplié par 5-6 à chaque culture). A ce niveau, le cal présente une structure homogène, il est composé de cellules indifférenciées, de cellules embryogènes et de cellules différenciées en voie de dégénérescence (Etienne *et al.*, 1997).

Régénération

A l'issue de chaque culture en entretien sur le milieu de prolifération, le cal peut être induit en régénération par la suppression progressive des phytohormones du milieu. Le développement des embryons est réalisé dans un système de culture particulier, récipient à immersion temporaire aéropulsée « RITA® », mis au point par le Cirad¹. Il permet de diminuer grandement le volume des manipulations, donc d'augmenter le rendement général du procédé. Les embryons suffisamment développés sont repiqués pour la germination sur milieu gélifié en tube. Un délai de quatre à six mois permet l'obtention des plants feuillés aptes à être acclimatés.

Acclimatation

Dans notre cas, l'acclimatation est précédée d'une expédition des vitroplants sur un site hévéicole en zone tropicale. Les aléas du transport sont responsables de pertes difficiles à prévenir, mais indépendantes de la technique. L'acclimatation proprement dite dure environ quatre mois. Elle implique une phase de sevrage assez délicate suivie d'une phase d'endurcissement pour un passage progressif aux conditions classiques de pépinière. Il apparaît préférable de réaliser la mise en champ huit à dix mois après le sevrage.

Résultats

Rendements du procédé ; cas du PB 260

Les données, présentées dans la figure 2, sont une moyenne des résultats obtenus sur quatre expériences réalisées du dernier se-

¹ Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

² Département des plantes à latex de l'Institut des forêts.

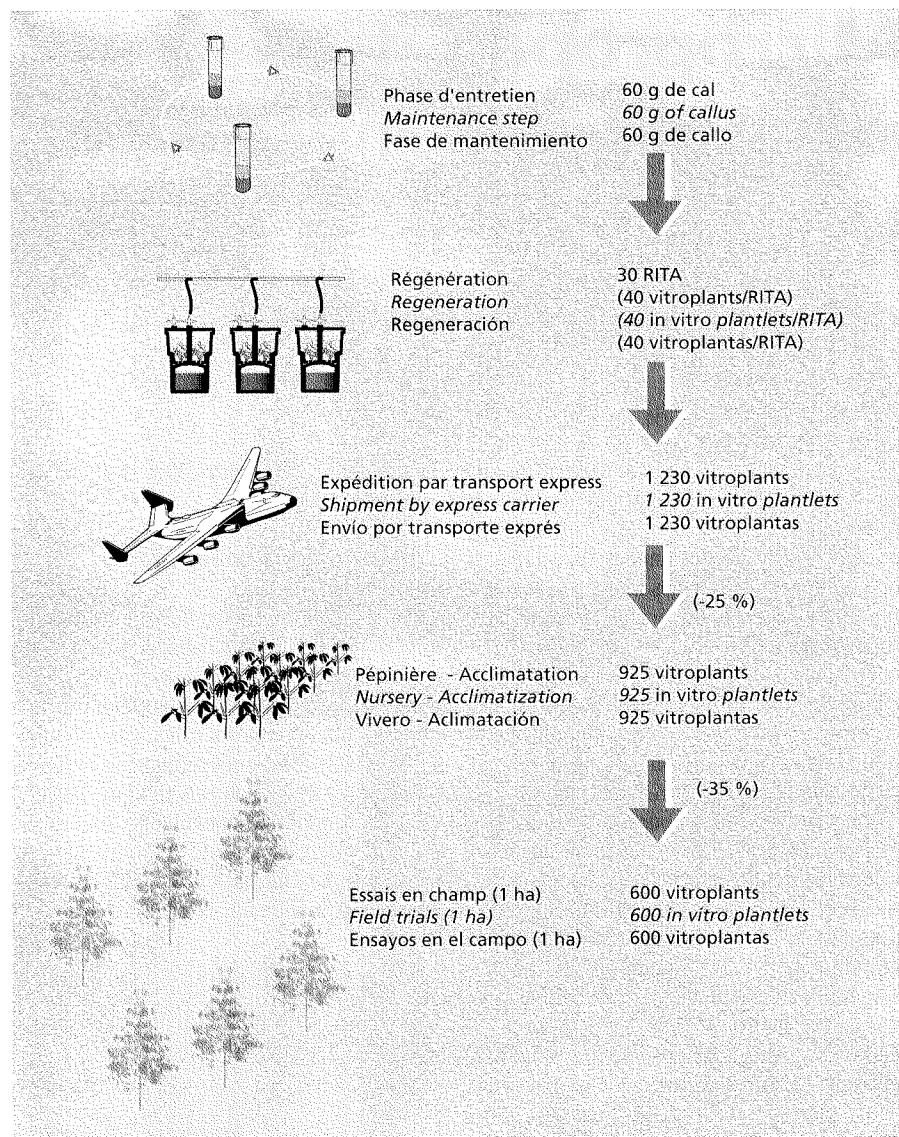


Figure 2. Les rendements actuels de la régénération par embryogenèse somatique chez l'hévéa (clone PB 260). / Current yields of Hevea regeneration by somatic embryogenesis (clone PB 260). / Los rendimientos actuales de la regeneración mediante embriogénesis somática en el hevea - Clon PB 260.

mestre 1996 au premier semestre 1997. Elles font apparaître que, dans l'état actuel de maîtrise, il faut environ 30 récipients de culture en régénération pour produire les plants nécessaires à l'établissement d'un hectare d'hévéas.

Comportement de différents génotypes

Une vingtaine de génotypes sélectionnés ont été testés vis-à-vis de leur aptitude à l'embryogenèse somatique et à former des lignées de cals friables proliférants (tableau). L'embryogenèse somatique a été menée à bien chez 12 génotypes mais, pour la moitié d'entre eux, ce phénomène est resté rare et peu reproductible. En revanche, pour six autres, des embryons so-

matiques ont été obtenus en grande quantité et de façon reproductible (PB 260, PR 107, PB 280, RRIM 600, PB 217, PB 310). Pour trois de ces génotypes, des lignées embryogènes entretenues ont été créées. A ce jour, plusieurs centaines de vitroplants ont été produits avec les clones PR 107 et PB 280, plusieurs milliers avec le PB 260.

Validation au champ, avantage du vitroplant

Des essais en champ avec des vitroplants issus d'embryogenèse somatique sont établis, en Côte d'Ivoire, en collaboration avec notre partenaire Idefor-Dpl² depuis 1992, et s'étendent à la fin 1997 sur environ 10 ha (Carron *et al.*, 1997). Plus récemment, des essais ont été mis en place avec le Rubber

Tableau. Comportement de 18 géotypes sélectionnés d'hévéa. / Performance of 18 selected Hevea genotypes. / Comportamiento de 18 genotipos seleccionados de hevea.

Génotype	Potentiel embryogène				Friabilité		Lignée embryogène entreteneue <i>Maintained embryogenic lines</i> Línea embriogénica mantenida
<i>Genotype</i>	<i>Embryogenic potential</i>				<i>Friability</i>		
Genotipo	Potencial embriogénico				Friabilidad		
	non obtenu <i>not obtained</i> no logrado	faible <i>poor</i> bajo	bon <i>good</i> medio	fort <i>high</i> alto	non obtenue <i>not obtained</i> no lograda	obtenue <i>obtained</i> lograda	
RIM 600*			X			X	
RRIM 712	X				X		
RRIM 703	X					X	
RRIM 729	X				X		
IRCA 18		X			X		
IRCA 130	X				X		
IRCA 109		X			X		
RRIC 100		X				X	
PB 254		X				X	
PB 217*			X		X		
PB 280**				X		X	X
PB 255	X					X	
PB 310*			X		X		
PB 330		X			X		
PB 260**				X		X	X
PR 107**				X		X	X
AVROS 2037	X				X		
GT1		X				X	

* Six géotypes embryogènes / Six embryogenic genotypes / Seis genotipos embriogénicos (PB 217, PB 280, PB 310, PB 260, PR 107, RRIM 600).

** Les 3 géotypes ayant donné des lignées friables. / The 3 genotypes which give maintained embryogenic lines. / Los 3 genotipos que dieron líneas embriogénicas.

Research Institute of Thailand (RRIT) près de Bangkok et avec la société Michelin, à la fin de 1997. Ils sont réalisés avec, au minimum, un témoin greffé classique et un dispositif statistique.

Un bilan de croissance, au cours des cinq premières années, a été fait chez le plus ancien de ces essais.

Chez le clone PB 260 (figure 3), la croissance du motif vitroplant est nettement supérieure à celle du greffé classique. De plus, l'accroissement annuel est constamment supérieur, ce qui se traduit par un écart de plus en plus grand entre les deux traitements. A la veille de la mise en saignée de l'essai, l'avantage du motif vitroplant est de 15 % pour la circonférence du tronc à 1 m. Mais le vitroplant présente aussi un plus fort degré de conicité de la base du tronc, un peu à l'image des *seedlings* (figure 4). Il s'agit très probablement d'un caractère de juvénilité. Cette plus forte conicité des vitroplants se traduit par une biomasse de la zone saignable (tronc entre 25 cm et 170 cm) supérieure de 34 % à celle du greffé classique. Si la mesure de la circonférence à 1 m constitue le critère agronomique classique afin de débiter l'ex-

ploitation de l'hévéa, la biomasse paraît le paramètre le plus fidèle pour caractériser la vigueur de l'arbre. Les derniers travaux d'E. Gohet, en physiologie de l'exploitation, conduisent à mettre ce paramètre directement en relation avec le potentiel de production pour un géotype donné (Gohet, 1996 ; Gohet *et al.*, 1996).

Chez le clone PR 107 (figure 5), la croissance apparaît, de prime abord, équivalente chez les deux motifs, vitroplant et greffé classique. Cependant, une analyse plus fine montre que l'accroissement annuel est toujours supérieur chez les vitroplants ce qui se traduit par un accroissement progressif de l'écart entre les deux traitements. Chez ce clone connu pour sa croissance très lente, les vitroplants ont un avantage de 3 % sur la circonférence du tronc à 1 m, avantage qui est en passe de devenir significatif. Par ailleurs, les troncs des vitroplants présentent également un certain degré de conicité qui se traduit par un avantage de 8 % en biomasse de la partie saignable du tronc.

Nous avons vérifié, pour ces deux clones, que les caractéristiques générales du houppier et la morphologie des organes floraux

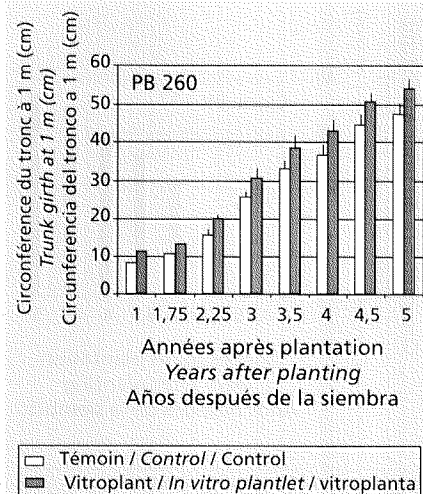


Figure 3. Croissance au cours des cinq premières années du témoin greffé et des vitroplants du clone PB 260 (20 arbres par traitement avec un dispositif en parcelles monoarbres). / Growth over the five first years for the budded control and in vitro plantlets of clone PB 260 (20 trees per treatment with a one-tree plot design). Crecimiento en los 5 años del testigo injertado y de las vitroplantas del clon PB 260 (20 árboles por tratamiento y un árbol por parcela).

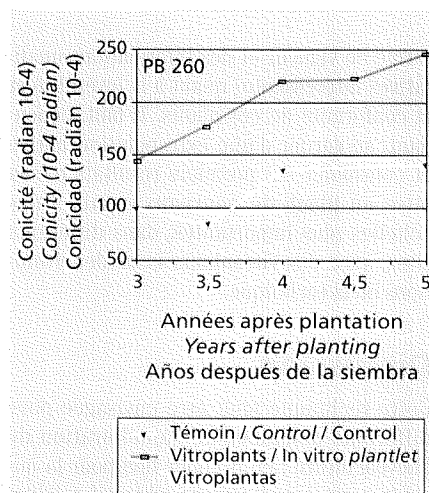


Figure 4. Conicité de la base du tronc pour le clone PB 260 selon la technique de propagation (témoin greffé contre vitroplants) (20 arbres par traitement avec un dispositif en parcelles monoarbres). / Trunk base conicity for clone PB 260 depending on multiplication technique (budded control vs in vitro plantlets) (20 trees per treatment with a one-tree plot design). Conicidad de la base del tronco para el clon PB 260 según la técnica de multiplicación (testigo injertado vs vitroplantas (20 árboles por tratamiento y un árbol por parcela).

étaient strictement conformes à celles du clone de greffe.

Cet essai a souffert de la difficulté de produire des vitroplants en 1991, donc d'une certaine hétérogénéité. Il donne, pourtant, des résultats prometteurs en

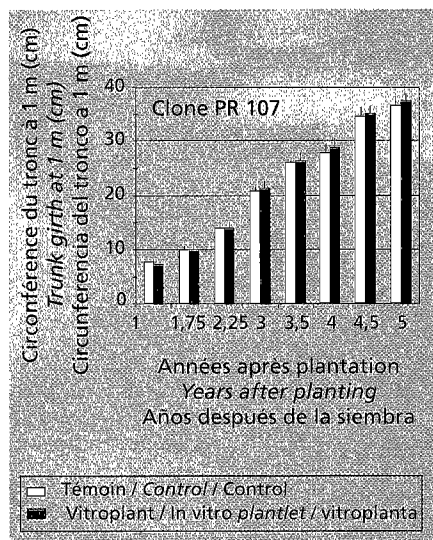


Figure 5. Croissance au cours des cinq premières années du témoin greffé et des vitroplants du clone PR 107 (66 arbres par traitement, 6 répétitions). / Growth over the five first years for the budded control and in vitro plantlets of clone PR 107 (66 trees per treatment, 6 replicates). / Crecimiento en los 5 primeros años del testigo injertado y de las vitroplantas del clon PR 107 (66 árboles por tratamiento, 6 repeticiones).

terme de vigueur et des informations qualitatives intéressantes quant à la juvénilité et la conformité de ces plants. Il faut, cependant, se garder d'une extrapolation hâtive et consolider ces premiers résultats par la mise en place de nouveaux essais à des échelles plus importantes, dans différents sites, avec des vitroplants issus des évolutions de la technique.

Discussion

Cette technique peut être envisagée pour différents domaines de l'amélioration de l'hévéaculture ; en premier lieu pour la micropropagation de masse, objectif originel de cette recherche.

Les résultats actuels permettent de produire quelques milliers de plants par an et par manipulateur. Dès aujourd'hui, ces plants doivent être utilisés pour des essais en champ, indispensables pour évaluer les caractéristiques agronomiques de ce nouveau matériel végétal. Il faut se souvenir que les conclusions de ces essais, en matière de production de latex, ne seront disponibles qu'aux environs des années 2010-2020.

En revanche, la maîtrise de la technique doit encore être améliorée avant d'envisager une phase pilote de production de vitro-

plants. Cette amélioration doit porter sur les rendements mais, aussi, sur la stabilité dans le temps des caractéristiques de prolifération et de régénération des lignées de cals. Cette stabilité sera recherchée à la fois par une meilleure maîtrise de l'état physiologique des cals maintenus en prolifération mais, aussi, par l'utilisation de la cryoconservation pour éviter que l'ensemble des cals soit maintenu en prolifération active pendant plusieurs années.

Par ailleurs, depuis l'obtention de la première lignée embryogène entretenue chez le clone PB 260 (1993), une quinzaine d'autres lignées ont été réalisées chez ce clone. Leurs caractéristiques ne sont pas équivalentes. Certaines ont été progressivement éliminées par suite de leur faible capacité de prolifération. D'autres ont un potentiel de régénération faible à moyen. Deux d'entre elles présentent à la fois un fort coefficient de prolifération et une forte capacité de régénération. Les lignées obtenues chez les clones PR 107 et PB 280 présentent à ce jour une capacité de régénération faible à moyenne. Ceci montre que l'obtention de lignées de cals entretenues, à forte capacité de régénération, chez différents génotypes sélectionnés, constitue également un objectif préalable au développement de la micropropagation de masse.

La mise au point de cette technique devrait également entraîner une modification des schémas de sélection afin d'intégrer la multiplication des hybrides sur leurs propres racines. Ceci permettrait de préparer, pour 2020, la sélection sur leurs propres racines de génotypes exceptionnels, en remplacement de ceux sélectionnés jusqu'à présent en clone de greffe. La multiplication végétative des hybrides sur leurs propres racines est, par ailleurs, indispensable pour sélectionner des porte-greffes spécialement adaptés à des conditions de sécheresse, de maladies de racines, etc.

Enfin, la régénération par embryogenèse somatique ouvre la porte aux manipulations génétiques. D'une façon générale, aujourd'hui, l'efficacité de la transformation génétique est relativement faible ; seule une très faible quantité de cellules incorpore correctement le fragment d'ADN³. Il est donc nécessaire que la technique de régénération soit bien maîtrisée pour que les chances de régénérer des plants transformés soient réelles. Les exigences ici ne sont pas exactement les mêmes que pour la propagation de masse : seuls les rendements du processus biologique sont considérés. ■

Bibliographie / References / Bibliografía

- CARRON M.P., ENJALRIC F., LARDET L., DESCHAMPS A., 1989. Rubber (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) In : Biotechnology in agriculture and forestry, Y.P.S. Bajaj éd., vol. 5, Trees II, Berlin, Allemagne, Springer, p. 222-245.
- CARRON M.P., ETIENNE H., MICHAUX-FERRIÈRE N., MONTORO P., 1995. Somatic embryogenesis in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). In : Somatic embryogenesis and synthetic seeds. I.Y.P.S. Bajaj éd., Berlin, Allemagne, Springer, coll. Biotechnology in agriculture and forestry 30, p. 353-369.
- CARRON M.P., DEA B.G., TISON J., LECONTE A., KÉLI J., 1997. Croissance en champ de clones d'*Hevea brasiliensis* issus de culture *in vitro*. Plant. Rech. Dév. 4 (4) : 264-273.
- ETIENNE H., LARTAUD M., CARRON M.P., MICHAUX-FERRIÈRE N., 1997. Use of calcium to optimize long-term proliferation of friable embryogenic calluses and plant regeneration in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). J. Exp. Botany 48 (306) : 129-137.
- GOHET E., 1996. La production de latex par *Hevea brasiliensis*. Relations avec la croissance. Influence de différents facteurs : origine clonale, stimulation hormonale, réserves hydrocarbonées. Thèse de doctorat, université Montpellier II, France, 343 p.
- GOHET E., PRÉVOT J.C., ESCHBACH J.M., CLÉMENT A., JACOB J.L., 1996. Clone, croissance et stimulation, facteurs de la production de latex. Plant. Rech. Dév. 3 (1) 30-38.
- MONTORO P., ETIENNE H., MICHAUX-FERRIÈRE N., CARRON M.P., 1993. Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 33 (3) : 331-338.

³ Acide désoxyribonucélique.

Hevea micropropagation by somatic embryogenesis

Carron M.P.¹, Lardet L.¹, Dea B.G.²

¹ CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

² IDEFOR-DPL, BP 1536, 01 Abidjan, Côte d'Ivoire

Research to develop somatic embryogenesis of *Hevea* (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) was undertaken as early as the 1970s. Like most woody species, *Hevea* was initially reputed to be recalcitrant to *in vitro* culture. After some years' research, *in vitro* plantlets were regenerated for several clones of commercial interest (Carron *et al.*, 1989). Several thousand *in vitro* plantlets have now been produced by this process, on an experimental level.

This article presents the different phases of maintained somatic embryogenesis, the yields obtained and the limiting factors with respect to large-scale plant production. Strategic pointers are given for the next ten years, with a view to completing development of the process and integrate it into conventional *Hevea* breeding schemes.

Material and methods

The phases of the process are shown in figure 1.

Callogenesis initiation

The initial explant is the inner integument of an immature seed: aseptic mother tissue possessing the genotype of the budded clone from which the seed was taken.

Somatic embryogenesis from primary callus

After one month's culture, the callus obtained can be directed towards the regeneration of somatic embryos. This approach was extensively worked on and described in several publications between 1985 and 1993 (Carron *et al.*, 1995).

Obtainment of proliferating friable lines

A new approach was defined in 1993. In the callogenesis medium, certain factors (Ca, sucrose, phytohormones) enable stimulation of friable lobe formation on calli (Montoro *et al.*, 1993). With several systematic transfers (4 to 6)

on such media this phenomenon can be stimulated, whilst inhibiting embryogenesis expression, i.e. the formation of somatic embryos. However, friability is not a sufficient trait; the callus also has to acquire a strong proliferation ability. The conditions required for that have yet to be accurately determined: scientists must therefore pay attention to detecting the few calli in the entire experiment that present this trait (0 to 5%). Histological monitoring shows whether the experimental conditions used are compatible with maintaining callus embryogenesis characteristics. Stabilization of the proliferating embryogenic line requires several further subcultures on a medium with a low phytohormone content to obtain a material of uniform structure expressing a constant proliferation level from one subculture to the next.

Maintaining embryogenic lines

Embryogenic lines are maintained on a proliferation medium with a low auxin and cytokinin concentration, by regular fortnightly transfers (the fresh weight is multiplied by 5-6 per culture). At this stage, the callus has a uniform structure and is composed of undifferentiated cells, embryogenic cells and degenerating differentiated cells (Etienne *et al.*, 1997).

Regeneration

At the end of each maintenance culture on the proliferation medium, the callus can be induced to regenerate by gradually eliminating phytohormones from the medium. Embryo development takes place in a special culture system, the pulsed air temporary immersion container or "RITA®" developed by CIRAD¹, which largely reduces handling operations and thus increases the overall yield of the process. Sufficiently developed embryos are transferred to a gel medium in tubes for germination. It takes four to six months to obtain shoots suitable for acclimatization.

Acclimatization

In our case, acclimatization is preceded by shipment to the tropical rubber growing zone. Transport problems are responsible for losses that are difficult to predict, but independent of the technique. Actual acclimatization takes approximately four months with quite a delicate

weaning stage, then a hardening phase for gradual transfer to conventional nursery conditions. It seems preferable to plant out 8 to 10 months after weaning.

Results

Yield of the process; case of PB 260

The data, shown in figure 2, are the mean of results obtained in four experiments conducted between the second half of 1996 and the first half of 1997. They show that as things stand at the moment, it takes around 30 regenerating culture recipients to produce the plants required to set up a 1-ha *Hevea* planting.

Performance of different genotypes

Around 20 selected genotypes were tested for their ability to produce somatic embryos and form proliferating friable callus lines (table). Somatic embryogenesis was obtained in 12 genotypes, but for half of them the phenomenon remained rare and not very reproducible. However, for six others, somatic embryos were obtained in large quantities in a reproducible way (PB 260, PR 107, PB 280, RRIM 600, PB 217, PB 310). Moreover, for three of those genotypes, established embryogenic lines were created. To date, several hundred *in vitro* plantlets have been produced from clones PR 107 and PB 280 and several thousand from PB 260.

Validation in the field, *in vitro* plantlets have the advantage

Field trials with *in vitro* plantlets obtained by somatic embryogenesis have been set up since 1992 with IDEFOR-DPL² in Côte d'Ivoire, with around 10 ha of trials by the end of 1997 (Carron *et al.*, 1997). More recently, trials were set up with the Rubber Research Institute of Thailand near Bangkok, and with Michelin, at the end of 1997. The trials are conducted with at least one conventionally budded control and a statistical design.

Growth over the first five years was analysed in the oldest of these trials.

For clone PB 260 (figure 3), growth was clearly better in the *in vitro* trees compared to the conventional budded control. Moreover, annual increment was systematically better, leading to an increasing gap between the two treatments. On the eve of tree opening in the

Paper presented at the seminar on "Biochemical and molecular tools for *Hevea* exploitation management and breeding" held at Mahidol University, Bangkok, Thailand, from 20th to 24th October 1997.

¹ Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

² Latex Plants Department of the Institut des forêts.

girth at 1 m was 15%, but they also had a higher degree of trunk base conicity, a little like seedlings (figure 4). This was most probably a juvenility trait. The greater conicity of the *in vitro* trees resulted in 34% more trunk biomass in the tappable zone (between 25 cm and 170 cm), compared to the conventionally budded trees. Although the 1 m girth is the conventional agronomic criterion for *Hevea* opening, biomass seems to be the most accurate parameter for characterizing tree vigour. The latest work by E. Gohet on the physiology of tapping led to this trait being placed directly in relation with production potential for a given genotype (Gohet, 1996; Gohet *et al.*, 1996).

For clone PR 107 (figure 5), there did not seem to be any difference in growth between the two treatments, *in vitro* trees and conventional budded ones. However, a closer analysis showed that the annual increment was always better in the *in vitro* trees, leading to a gradual increase in the gap between the two treatments. For this clone, which is known for its very slow growth, the trunk girth of the *in vitro* trees at 1 m was 3% better, an advantage that is starting to become significant. In addition, the trunks of the *in vitro* trees also revealed a certain degree of conicity, resulting in 8% more biomass in the tappable part of the trunk.

For these two clones, we were able to check that the general characteristics of the canopies and the morphology of the floral organs were strictly true-to-type.

This trial suffered from the difficulty in producing *in vitro* plantlets in 1991, hence to the initial heterogeneity of *in vitro* plantlets.

³ Desoxyribonucleic acid.

However, it has given promising results in terms of vigour and interesting qualitative information as to the juvenility and conformity of these plants. However, hasty extrapolation should be avoided and these initial results should be consolidated by continuing to set up new trials on a larger scale, at different sites, with *in vitro* plantlets derived from changes made to the technique.

Discussion

Use of this technique can be considered in various fields of *Hevea* breeding, firstly for mass micropropagation, which was the original purpose of this research.

As things stand, several thousand plants can be produced per year per operator. Those plants should now be used to set up field trials that are essential for assessing the agronomic traits of this new plant material. It should be remembered that the conclusions of these trials for latex production will not be available before 2010 or so.

Nevertheless, the technique needs to be mastered better before any thought can be given to setting up an *in vitro* production pilot phase. The yields need to be increased, but the stability of callus line proliferation and regeneration characteristics over time also needs to be improved. Such stability will be sought both through more effective control of the physiological state of maintained proliferating calli and through the use of cryopreservation to avoid maintaining all the calli under active proliferation for several years.

Also, since the first maintained embryogenic line was obtained from clone PB 260 (1993),

around 15 other lines have been obtained from the same clone. They do not have the same characteristics: some have gradually been discarded because of their low proliferation capacity. Others have a low to moderate regeneration potential. Two of them simultaneously reveal a high proliferation coefficient and a high regeneration ability. The lines obtained from PR 107 and PB 280 have revealed a low to moderate regeneration capacity so far. This shows that obtaining maintained callus lines with a high regeneration capacity for different selected genotypes is another prerequisite for any development of mass micropropagation.

Development of this technique should also entail a change in breeding schemes to integrate hybrid propagation on their own roots. This would make it possible to prepare for the breeding in 2020 of exceptional genotypes on their own roots to replace those bred to date as budded clones. Vegetative propagation of hybrids on their own roots is also essential for selecting rootstocks specially adapted to drought conditions, root diseases, etc.

Lastly, regeneration by somatic embryogenesis paves the way for genetic engineering. Generally speaking nowadays, the efficacy of genetic transformation is relatively slight; only a very small percentage of cells correctly incorporates the DNA³ fragment. It is therefore necessary to effectively master the regeneration technique if the chances of regenerating transformed plants are to become real. The requirements in this case are not exactly the same as for mass propagation: only the yields of the biological process are considered. ■

Micropropagación del hevea mediante embriogénesis somática

Carron M.P.¹, Lardet L.¹, Dea B.G.²

¹ CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

² IDEFOR-DPL, BP 1536, 01 Abidjan, Côte d'Ivoire

A partir de los años setenta, se emprendieron investigaciones para poner a punto la embriogénesis somática del hevea (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). Como la mayoría de las especies leñosas, el hevea fue en un principio reputado recalcitrante al cultivo *in vitro*. Después de varios años de investigaciones, se regeneraron vitroplantas de varios clones de interés industrial (Carron *et al.*, 1989). Hoy en día, se han producido varios millares de vitroplantas mediante este proceso, en un marco experimental.

En primer lugar, presentamos distintas fases de un proceso de embriogénesis somática mantenida, y luego los rendimientos logrados y, por último, los factores limitantes en una perspectiva de producción de plantas a gran escala. Se proponen elementos de estrategia para los diez años venideros para terminar la puesta a punto del proceso y su integración en los esquemas clásicos de mejora del hevea.

Material y métodos

Se esquematizan las fases del proceso en la figura 1.

Iniciación de la callogénesis

El tegumento interno de la semilla no madura constituye la explanta inicial: tejido maternal aséptico que posee el genotipo del clon de injerto del cual se ha separado el fruto.

Embriogénesis somática a partir de callo primario

Después de un mes de cultivo, el callo logrado puede ser conducido hacia la regeneración de embriones somáticos. Esta vía fue abundantemente estudiada y descrita en varias

publicaciones entre 1985 y 1993 (Carron *et al.*, 1995).

Obtención de líneas friables proliferantes

Desde 1993 se ha definido una nueva vía. En el medio de la callogénesis, ciertos parámetros (Ca, sacarosa, fitohormonas) permiten estimular la formación de lóbulos friables en los callos (Montoro *et al.*, 1993). Varios trasplantes sistemáticos (4 a 6), en medios semejantes, permiten estimular este fenómeno, e inhibir al mismo tiempo la manifestación de la embriogénesis, es decir la formación de los embriones somáticos. No obstante, la friabilidad no es un carácter suficiente; también es preciso que el callo adquiera una fuerte capacidad de proliferación. No se han determinado aún con precisión las condiciones de adquisición de la misma. Por lo tanto, el experimentador debe prestar atención para descubrir, durante todo el experimento, los pocos callos que manifestarán este carácter (entre 0 y 5%). Un seguimiento histológico permite verificar que las condiciones experimentales utilizadas son compatibles con el mantenimiento de las características embriogénicas del callo. La estabilización de la línea embriogénica proliferante necesita, de nuevo, varios subcultivos en un medio empobrecido en fitohormonas, para conseguir un material de estructura homogénea y que manifieste un nivel de proliferación regular, de un subcultivo a otro.

Mantenimiento de las líneas embriogénicas

Las líneas embriogénicas se mantienen, en un medio de proliferación levemente concentrado en auxina y citoquinina, mediante trasplantes regulares cada 15 días (el peso fresco se multiplica por 5-6 en cada cultivo). A este nivel, el callo presenta una estructura homogénea, es compuesto de células indiferenciadas, de células embriogénicas y de células diferenciadas en vías de degeneración (Etienne *et al.*, 1997).

Regeneración

Al final de cada cultivo en mantenimiento en el medio de proliferación, el callo puede ser inducido en regeneración mediante la supresión progresiva de las fitohormonas del medio. El

desarrollo de embriones se realiza en un sistema de cultivo especial, o sea la bandeja de inmersión temporal aeropulsada "RITA®" puesta a punto por el CIRAD¹, que permite una importante reducción de las manipulaciones, resultando en un mayor rendimiento general del proceso. Los embriones suficientemente desarrollados se transplantan para la germinación sobre un medio gelificado en tubo. Un plazo de cuatro a seis meses permite obtener plántulas que empiezan a tener hojas, aptas a aclimatarse.

Aclimatación

En el presente caso, previamente a la aclimatación, se envían las vitroplantas a un sitio heveícola en zona tropical. Los riesgos del transporte son responsables de pérdidas difíciles de anticipar, pero independientes de la técnica. La aclimatación propiamente dicha dura unos cuatro meses. Implica una fase de cambio de sustrato bastante difícil seguida de una fase de endurecimiento, para un paso progresivo a las condiciones clásicas de vivero. Resulta preferible realizar la siembra en el campo entre ocho y diez meses después del cambio de sustrato.

Resultados

Rendimientos del proceso; caso del PB 260

Los datos presentados en la figura 2 son un promedio de los resultados logrados en cuatro experimentos realizados del último semestre de 1996 hasta el primer semestre de 1997. Demuestran que, en el estado actual de dominio, se necesitan unas 30 bandejas de cultivo en regeneración para producir las plántulas necesarias para establecer una hectárea de heveas.

Comportamiento de distintos genotipos

Se sometieron a prueba unos veinte genotipos seleccionados para determinar a su aptitud a la embriogénesis somática y a formar líneas de callos friables proliferantes (cuadro). La embriogénesis somática fue llevada a cabo en 12 genotipos pero, para la mitad de ellos, este fenómeno fue poco frecuente y poco reproducible. En cambio, para los otros seis, se

Ponencia presentada en el seminario "Las herramientas bioquímicas y moleculares para el manejo de la explotación y el mejoramiento del hevea" celebrado en la universidad de Mahidol, Bangkok, Tailandia, entre el 20 y el 24 de octubre de 1997.

¹ Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

² Departamento de las plantas de látex del Institut des forêts.

lograron embriones somáticos en gran cantidad y de manera reproducible (PB 260, PR 107, PB 280, RRIM 600, PB 217, PB 310). Para tres de estos genotipos, se crearon líneas embriogénicas mantenidas. A la fecha, varios centenares de vitroplantas han sido producidos con los clones PR 107 y PB 280, varios millares con el PB 260.

Validación en el campo, ventaja para la vitroplanta

Se instalan ensayos en el campo con vitroplantas procedentes de embriogénesis somática, en Côte d'Ivoire, en colaboración con nuestro asociado Idefor-Dpl 2 desde 1992, y se extienden hasta fines de 1997 en unas 10 ha (Carron *et al.*, 1997). Más recientemente, se instalaron ensayos con el Rubber Research Institute of Thailand (RRIT), cerca de Bangkok, y con la empresa Michelin, a fines de 1997. Se realizan con, como mínimo, un testigo injertado clásico y un dispositivo estadístico.

Un balance de crecimiento durante los primeros cinco años se realizó con el más antiguo de estos ensayos.

En el clon PB 260 (figura 3), el crecimiento en el caso de vitroplanta resulta nítidamente superior al crecimiento del injertado clásico. Además, el incremento anual es constantemente superior, lo que se expresa por una diferencia cada vez mayor entre ambos tratamientos. En la víspera de la puesta en pica del ensayo, la ventaja del motivo vitroplanta es de un 15% para la circunferencia del cuello a 1 m. Pero la vitroplanta presenta también un mayor grado de conicidad de la base del tronco, un poco como los *seedlings* (figura 4). Se trata muy probablemente de un carácter de juvenilidad. Esta mayor conicidad de las vitroplantas se expresa por una biomasa de la zona a picar (tronco entre 25 cm y 170 cm) superior en un 34% a la del injertado clásico. Si la medición de la circunferencia a 1 m constituye el criterio agronómico clásico para iniciar la explotación del árbol de hule hevea, la biomasa parece el parámetro más fiable para caracterizar el vigor del árbol. Los últimos trabajos de E. Gohet, en fisiología de la explotación, llevan a relacionar este parámetro directamente con el potencial de producción para un genotipo dado (Gohet, 1996; Gohet *et al.*, 1996).

En el clon PR 107 (figura 5), el crecimiento parece, en un primer momento, equivalente en ambos casos, la vitroplanta y el injertado clásico.

No obstante, un análisis más profundo muestra que el incremento anual es siempre superior en las vitroplantas, lo que se manifiesta en un incremento progresivo de la diferencia entre ambos tratamientos. En este clon conocido por su crecimiento muy lento, las vitroplantas tienen una ventaja de un 3% en la circunferencia del tronco a 1 m, ventaja que está en vías de resultar significativa. Por otro lado, los troncos de las vitroplantas presentan también cierto grado de conicidad que se manifiesta por una ventaja de un 8% en biomasa de la parte a picar del tronco.

Hemos verificado, para estos dos clones, que las características generales de la copa y la morfología de los órganos florales eran estrictamente conformes con los del clon de injerto.

Aunque este ensayo presentó ciertas dificultades en la producción de vitroplantas en 1991, debido principalmente a la heterogeneidad inicial de estas, ofrece unos resultados prometedores en términos de vigor y de las informaciones cualitativas interesantes en cuanto a la juvenilidad y la conformidad de estas plántulas. No obstante, es preciso abstenerse de una extrapolación apresurada y consolidar estos primeros resultados mediante la instalación de nuevos ensayos a escalas más importantes, en distintos sitios, con vitroplantas procedentes de las evoluciones técnicas.

Discusión

Esta técnica puede aplicarse a diferentes áreas del mejoramiento de la heveicultura; en primer lugar para la micropropagación de masa, objetivo original de esta investigación.

Los resultados actuales permiten producir algunos millares de plántulas por año y por manipulador. Desde hoy mismo, estas plántulas deben ser utilizadas para ensayos en campo, indispensables para evaluar las características agronómicas de este nuevo material vegetal. Cabe recordar que no se podrá disponer de las conclusiones de estos ensayos, en materia de producción de látex, hasta los años 2010-2020 aproximadamente.

Por otro lado, se tiene que mejorar aún más el dominio de la técnica antes de poder pasar a una fase piloto de producción de vitroplantas. Esta mejora debe repercutir sobre los rendimientos, pero también, sobre la estabilidad duradera de las características de proliferación y de regeneración de las líneas de callos. Se buscará

esta estabilidad no sólo mediante un mejor control del estado fisiológico de los callos mantenidos en proliferación, sino también mediante el uso de la crioconservación para evitar que los callos sean mantenidos en proliferación activa durante varios años.

Por otro lado, desde la obtención de la primera línea embriogénica mantenida en el clon PB 260 (1993), se han realizado otras quince líneas más de este clon. Sus características no son equivalentes. Algunas fueron progresivamente eliminadas debido a su capacidad reducida de proliferación. Otras tienen un potencial de regeneración de bajo a medio. Dos de ellas presentan a la vez un fuerte coeficiente de proliferación y una fuerte capacidad de regeneración. Actualmente, las líneas logradas en los clones PR 107 y PB 280 presentan una capacidad de regeneración de baja a mediana, lo que muestra que la obtención de líneas de callos mantenidos, con fuerte capacidad de regeneración, en distintos genotipos seleccionados, constituye también un objetivo previo al desarrollo de la micropropagación de masa.

La puesta a punto de esta técnica debería también acarrear una modificación de los esquemas de selección a fin de integrar la multiplicación de los híbridos en sus propias raíces. Esto permitiría preparar, para el 2020, la selección en sus propias raíces, de genotipos excepcionales, en sustitución de los seleccionados hasta ahora en clon de injerto. La multiplicación vegetativa de los híbridos en sus propias raíces resulta, por otro lado, imprescindible para seleccionar porta injertos especialmente adaptados a las condiciones de sequía, de enfermedades de las raíces, etc.

Por último, la regeneración mediante embriogénesis somática resulta en manipulaciones genéticas. De modo general, hoy en día, la eficiencia de la transformación genética es relativamente baja; sólo una muy baja cantidad de células incorpora correctamente el fragmento de ADN³. Por lo tanto, resulta necesario dominar correctamente la técnica de regeneración para que las posibilidades de regenerar plántulas transformadas sean efectivas. Las exigencias en este caso no son exactamente las mismas que para la propagación de masa: sólo se examinan los rendimientos del proceso biológico. ■

³ Ácido desoxirribonucleico.